

10 Rec'd PCT/PTO 02 SEP 2004
10 JUN 2005

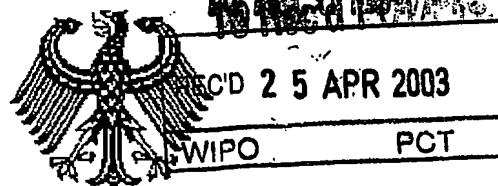
PCT/EP 03 / 02198

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

10/506862

10 Rec'd PCT/PTO 02 SEP 2004

EPO - DG 1



96

PRIORITY DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 09 744.5

Anmeldetag: 06. März 2002

Anmelder/Inhaber: Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., München/DE

Bezeichnung: Modifizierte oxidische Nanopartikel mit hydrophoben
Einschlüssen, Verfahren zu ihrer Herstellung und
Verwendung

IPC: C 09 C, C 08 K, G 01 N

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 19. März 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Wallner

A 9161
03/00
EDV-L

BEST AVAILABLE COPY

Erfindungsmeldung

Modifizierte oxidische Nanopartikel mit hydrophoben Einschlüssen, Verfahren zu ihrer Herstellung und Verwendung

1. Stand der Technik

Latexpartikel sind hydrophob und als Host für hydrophobe Moleküle sehr geeignet und im Einsatz [1]. Silicatpartikel sind naturgemäß hydrophil und eignen sich daher nicht als Host für hydrophobe Moleküle. Zwar sind fluorhaltige Beschichtungen auf SiO₂-Basis bekannt (Lotus-Effekt, Easy to clean Oberflächen, Brechzahlanpassung – [2]); aber aufgrund des schnellen Vergelens bei der Partikelherstellung mit Fluoralkyltrialkoxysilanen sind noch keine Silicatpartikel synthetisiert worden. Diese wären jedoch wünschenswert damit hydrophobe Moleküle auch in SiO₂-Partikel eingeschlossen werden können.

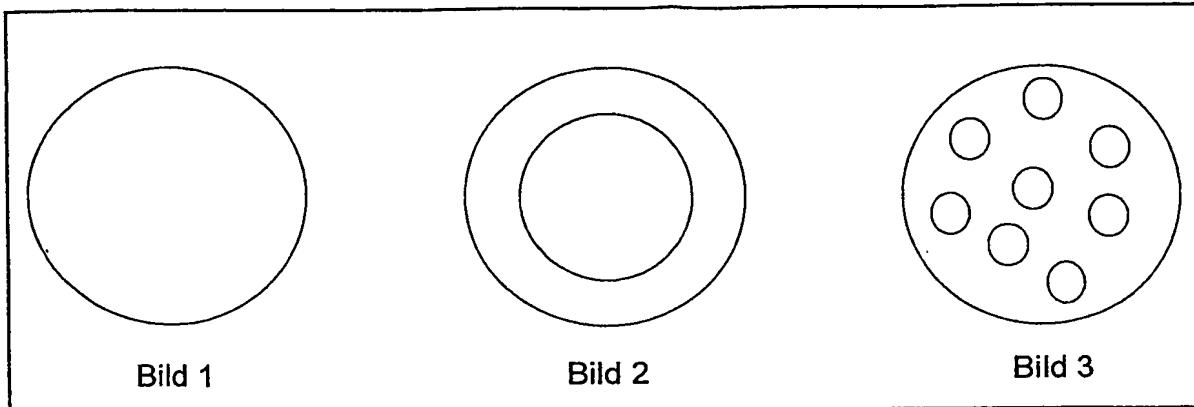
Deshalb war es Ziel der Erfindung Silicatpartikel mit Fluororganyl- und / oder Arylalkoxysilanen so zu modifizieren, dass Komplexe oder organische Farbstoffe, die in hydrophoben Medien beste spektroskopische Eigenschaften besitzen, in SiO₂-Partikel einzubinden sind und dort ihre guten spektroskopischen Eigenschaften beibehalten. Dies könnte beispielsweise für medizinische, biochemische oder optische Anwendungen sehr vorteilhaft sein. Organische in Wasser dispergierte Nanopartikel finden zwar in der Pharmazie, Kosmetik, Pflanzenschutz und Ernährung immer mehr Anwendung, jedoch sind beispielsweise Lösungsmittelreste noch vorhanden, die sich auf die jeweiligen Anwendungen nachteilig auswirken können. Zu dieser Problematik finden z.Z. intensive Forschungen statt [3]. Da die Silicatpartikel auf nasschemischen Weg in einem Wasser-Ethanolgemisch synthetisiert werden, besitzen sie naturgemäß keine Tenside, Stabilisatoren, usw. Zusätzlich ist eine multifunktionelle Oberfläche vorhanden, die je nach Anforderung modifiziert werden kann – sei es beispielsweise mit Carboxylfunktionalitäten (als Biolinker) oder Fluororganylgruppen (Beeinflussung der physikalisch- chemischen Oberflächeneigenschaften).

2. Erfindung

Der Gegenstand der Erfindung sind Partikel, die erhalten wurden durch Hydrolyse und Kondensation von Sol-Gel-Vorstufen von Elementen der Gruppen 1-15, vorzugsweise Si (Ti, Zr, Al) in Kombination mit hydrophoben Sol-Gel-Vorstufen wie beispielsweise perfluorierte-alkyl-trialkoxysilane (3,3,3-Trifluoropropyltrimethoxysilan) oder Bis-(trialkoxysilylalkyl)benzole (Bis(trimethoxysilylethyl)benzol).

3. Beschreibung

Die Partikel bestehen vorzugsweise aus einem anorganisch-oxidischen Kern. Dieser kann homogen oder heterogen (Kern-Schale-Typ (2), Rosinenkuchen-Modell (3)) aufgebaut sein. Kombinationen der beschriebenen Partikeltypen sind auch möglich.



Die Herstellung der Partikel erfolgt mittels des Sol-Gel-Verfahrens. So können die Kerne von Partikeltyp 1, 2 und 3 in Anlehnung an den Stöber-Prozess, Emulsions- bzw. Aersolverfahren dargestellt werden.

Durch die Modifizierung des Partikelinneren ist es möglich neben Lanthanoid-Komplexen sowohl hydrophobe als auch oleophobe Moleküle / Komplexe in die ursprünglich hochpolare oxidische Matrix zu bringen. Die Partikelloberfläche kann beispielsweise mit Carboxyl-, Amino-, Mercapto-, Epoxy- oder Aldehydgruppen funktionalisiert werden. Dies kann u.a. durch Silanisierung erfolgen. Die Partikelgröße kann mit enger Größenverteilung vom Nano- bis Mikrometerbereich eingestellt werden.

4. Beispiele

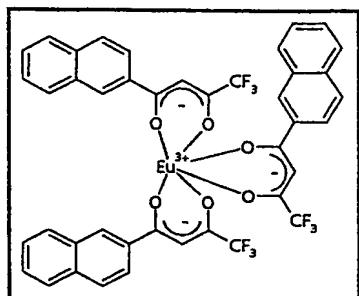
Beispiel 1:

Zu einer temperierten Lösung aus 61 ml Wasser, 40 ml Ethanol und 14 ml Ammoniumhydroxidlösung werden sukzessive 20 ml TEOS und eine Mischung aus 20 mg Tris-[4,4,4-Trifluoro-1-(2-naphthyl)-1,3-butandion]-Eu(III), 1 ml Dichlormethan und 0,25 ml 3,3,3-Trifluoropropyltrimethoxysilan, gegeben. Die Reaktionsmischung wird 4 Stunden bei 30 °C gerührt und weitere 15 Stunden bei Raumtemperatur.

Die erhaltene Dispersion wird durch mehrere zentrifugative Waschzyklen gereinigt. Dabei wird der jeweilige Überstand mittels UV-Vis- und Fluoreszenzspektroskopie auf Anteile des Komplexes überprüft.

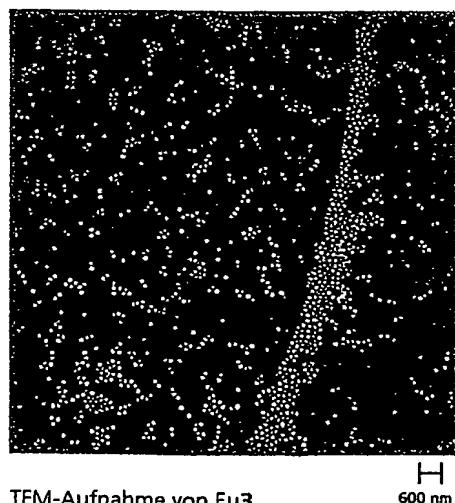
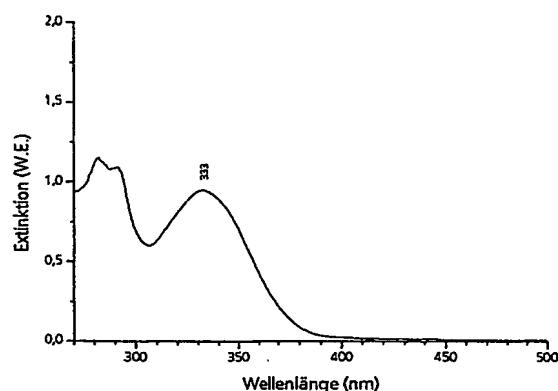
CharakterisierungStrukturformel

Tris-[4,4,4-Trifluoro-1-(2-naphthyl)-1,3-butandion]-Eu(III)

UV-VIS Spektrum

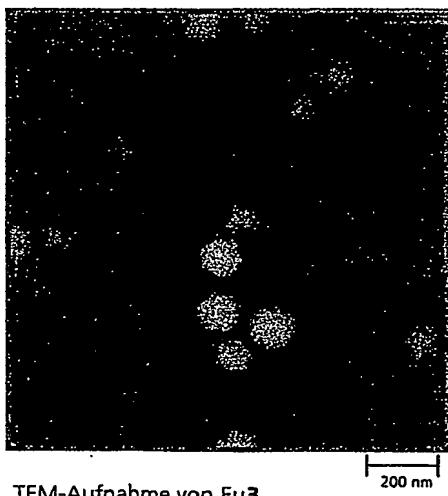
(CH₂Cl₂/EtOH; 1:1)

$\lambda_{\text{Abs.}} = 333 \text{ nm}$



TEM-Aufnahme von Eu3
Vergrößerung = 6300 x

600 nm



TEM-Aufnahme von Eu3
Vergrößerung = 63000 x

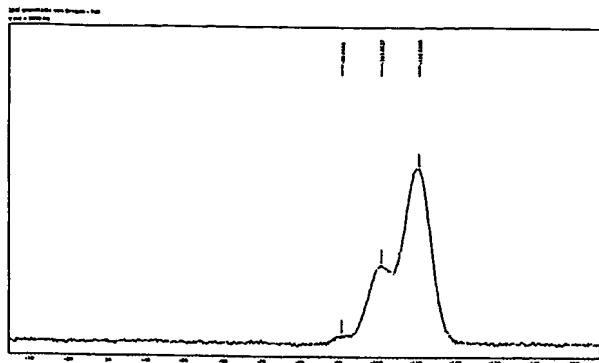
200 nm

4.9 $\mu\text{mol/g}$ SiO₂ Eu(NTA)₃ - Komplex in 130-158 nm SiO₂-Partikeln

RFA: berechnete Menge an Europium in Eu3 = 0.07%

RFA: gefundene Menge an Europium in Eu3 = 0.05%

MAS ^{29}Si -Festkörper-NMR Spektrum von Eu₃/SiO₂

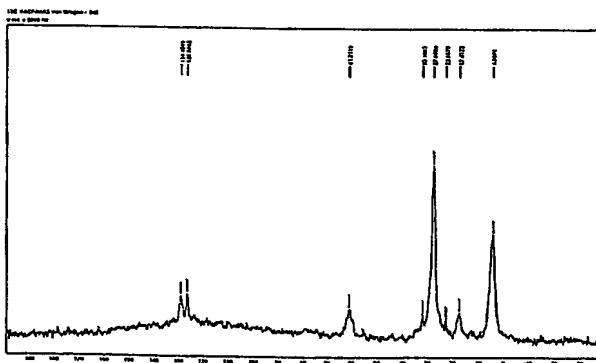


Interpretation

Integration liefert:

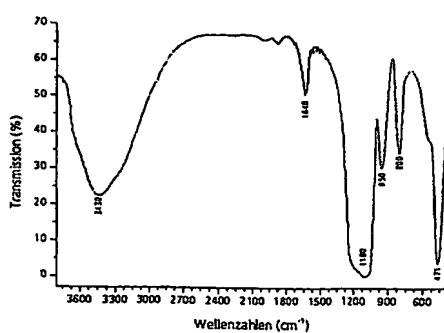
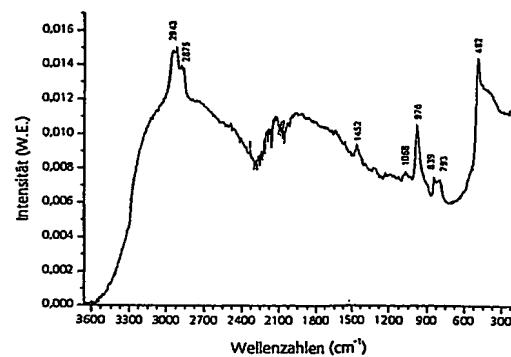
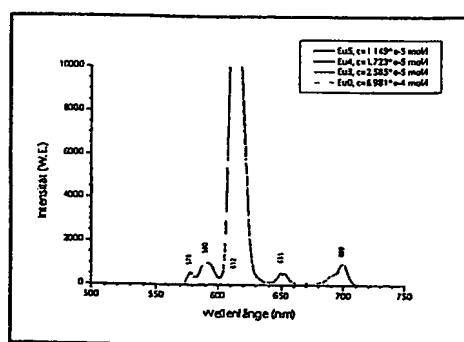
- a) 110.7 ppm; Q⁴-Gruppen, 70.54 %
- b) 101.1 ppm; Q³-Gruppen, 27.24 %
- c) 91.0 ppm; Q²-Gruppen, 2.21 %

VACP/MAS ^{13}C -Festkörper-NMR-Spektrum von Eu₃



Interpretation

- a) 129.4 / 126.7 ppm; arom. C-H
- b) 61.2 ppm; CH₂-OH
- c) 27.6 ppm; CH₂-CH₂-CF₃
- d) 17.4 ppm; CH₃-CH₂-OH
- e) 4.5 ppm; Si-CH₂-CH₂-CF₃

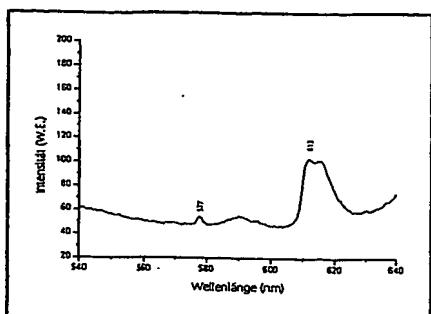
IR-SpektrumEu₃/SiO₂ als KBr-Preßling $\nu(\text{O-H}) = 3430 \text{ cm}^{-1}$ $\delta(\text{H}_2\text{O}) = 1640 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{Si-O-Si}) = 1100 \text{ cm}^{-1}$ (as) $\nu(\text{Si-O-Si}) = 800 \text{ cm}^{-1}$ (sym) $\delta(\text{Si-O-Si}) = 471 \text{ cm}^{-1}$ (?)Raman SpektrumFeststoffprobe von Eu₃/SiO₂ $\nu(\text{C-H})_{\text{aliph.}} = 2943, 2875 \text{ cm}^{-1}$ (as) $\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2) = 1452 \text{ cm}^{-1}$ $\nu(\text{Si-O-Si}) = 1068 \text{ cm}^{-1}$ (as) $\nu(\text{Si-O-Si}) = 839, 793 \text{ cm}^{-1}$ (sym) $\delta(\text{Si-O-Si}) = 482 \text{ cm}^{-1}$ **Fluoreszenzspektrum von Eu(NTA)₃**Emissionsbanden

- $\lambda_{\text{Em}} = 578 \text{ nm}$ $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_0$
- $\lambda_{\text{Em}} = 590 \text{ nm}$ $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_1$
- $\lambda_{\text{Em}} = 612 \text{ nm}$ $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_2$
- $\lambda_{\text{Em}} = 651 \text{ nm}$ $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_3$
- $\lambda_{\text{Em}} = 699 \text{ nm}$ $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_4$

 $\lambda_{\text{Exc.}} = 333 \text{ nm}$

*Lit.: R. Reisfeld et al., J. of Alloys and Compounds 300-301 (2000), 147-151.

Fluoreszenzspektrum von Eu³⁺ Partikeln



Vermessung einer Feststoffprobe von Eu³⁺, welche auf einen Objekträger fixiert wurde.

Einstellungen:

Leistung = 950 mV, Spaltweiten = EX/EM=10/1

Lichtquelle = Xenonlampe

$\lambda_{\text{exc}} = 333 \text{ nm}$

$\lambda_{\text{em}} = 613 \text{ nm}$

5. Anwendung

Beeinflussung von Brechungsindex und Dichte von SiO₂-Partikel. Durch hydrophobe (fluorierte) Umgebung in den Silicatpartikeln zeigen beispielsweise Fluorophore kein Quenching, das auf Wasser zurückzuführen ist.

Partikel können nach Oberflächenfunktionalisierung mit Antikörpern gekoppelt werden. Besonders geeignet ist eine bioanalytische Anwendung in Form von Teststreifen-Assays. Die Einarbeitung in beliebige Polymermatrices ist möglich (z.B. ORMOCER®). Andere Anwendungsbereiche: Pigmente, Tinten, Sicherheitsmarker, Additive.

6. Literatur

- [1] H. Kawaguchi, *Prog. Polym. Sci.* **2000**, 25, 1171-1210.
- [2] J. Kron, K. Rose, K.-J. Deichmann, G. Schottner, K.-H. Haas, 2. Wörlitzer Workshop: *Funktionelle Schichten – Adhäsive und antiadhäsive Oberflächen* (Fördergemeinschaft „Dünne Schichten“ e.V.), Tagungsband **2000**.
- [3] D. Horn, J. Rieger, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 4460-4492.

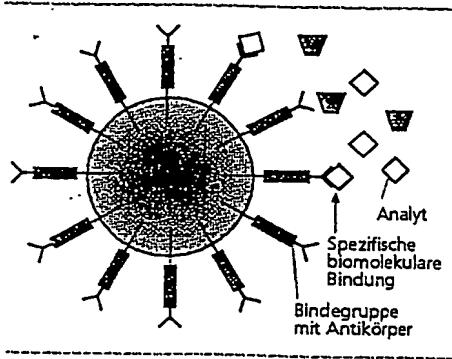


Bild 1
schematische Darstellung eines homogen geärbten Nanopartikels, an der Oberfläche mit biomolekularen Bindegruppen ausgerüstet

Ausgangssituation

Biosensoren zum chemischen Nachweis von Biomolekülen wie Antigenen oder Haptenen, die spezifisch für ein bestimmtes Krankheitsbild sind, stellen eine wichtige Anwendung in der medizinischen Diagnostik und Bioanalytik dar. Solche Sensoren können z. B. in Form chromatographischer Teststreifen realisiert werden, die auf ein Vlies aufgebrachte Detektorreagenzien enthalten.

Dies können spezielle, an ihrer Oberfläche mit spezifischen Anbindungs-partnern (z. B. Antikörper oder DNA-Fragmente) ausgerüstete Nanopartikel sein, die ausschließlich an den gesuchten Stoff binden. Die Partikel tragen Signalgruppen, sogenannte Marker, die über einfache analytische Methoden, beispielsweise über UV-VIS-Absorptions- oder Fluoreszenzmessung, sichtbar gemacht werden können. Nach Aufbringung der zu untersuchenden Blutprobe liefern die Partikel bei Anwesenheit des gesuchten Stoffs ein farbiges oder fluoreszentes Signal.

struktur der Partikel kovalent einbauen lassen. Biomoleküle können nicht in die Partikel eindringen und die Eigen-schaften der Chromophore somit nicht beeinflussen.

Eine große Anzahl organischer Absorp-tions- und Fluoreszenzfarbstoffe kann je nach Anforderung eingesetzt wer-den. Die gefärbten Partikel können optional mit einer weiteren (ungefärbten) Silicatschale versehen oder für die An-bindung von Biomolekülen modifiziert werden. Hierzu werden in einer Mono-lage spezielle bifunktionelle Moleküle aufgebracht, die einerseits fest an der silicatischen Oberfläche verankert und andererseits mit dem biologischen Bindemolekül verknüpft werden. Bild 1 zeigt schematisch den Aufbau eines solchen Partikels.

Die transmissionselektronenmikro-skopische Aufnahme in Bild 2 zeigt kugelförmige, im Durchschnitt 150 nm durchmessende, fluoreszente und oberflächenmodifizierte Partikel mit sehr enger Größenverteilung.

Organisch modifizierte Silicat-Nano-partikel als Fluoreszenzmarker

Das Fraunhofer ISC entwickelt neuarti-ge, organisch-modifizierte Silicat-Nano-partikel, die besonders vorteilhaft in Biosensoren eingesetzt werden kön-nen. Die Partikel werden über ein näs-chemisches Niedertemperaturverfahren hergestellt, das es erlaubt, organische Farbstoffe oder Fluorophore homogen in Silicatpartikel einzubringen und sie dort chemisch zu verankern, ohne ihre optischen Eigenschaften zu verändern.

Die organischen Farbstoffmoleküle werden hierzu chemisch modifiziert, so dass sie sich in die anorganische Silicat-

Kundennutzen

Die nanopartikulären Fluoreszenzmar-ker können für verschiedenste Anwen-dungen in der Chemo- und Bioanalytik eingesetzt werden und stellen eine hochstabile Alternative zu Latexparti-keln dar. Aufgrund der Vielseitigkeit des zugrunde liegenden Herstellungs-verfahrens können die Partikel je nach Kundenanforderung maßgeschneidert werden und besitzen im Vergleich zu

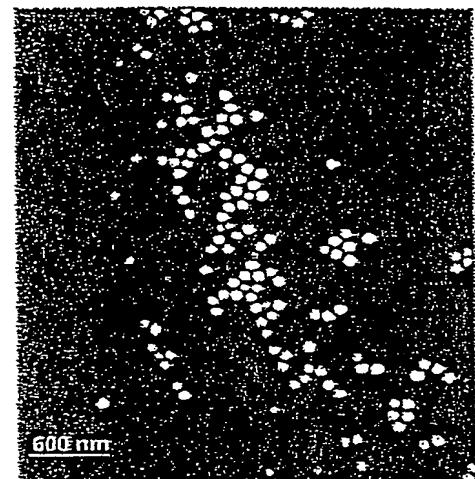
über andere Verfahren gefärbten Partikeln deutliche Vorteile.

Die Teilchengröße kann im Bereich zwischen ca. 100 und 800 nm variiert werden. Bedingt durch den Herstellungsprozess zeigen die Nanopartikel hohe Farbstoffgehalte, aber keinerlei Farbstoffblutung. Sie können leicht aufgereinigt, redispersiert oder gefriergetrocknet werden und zeichnen sich durch exzellentes Laufverhalten auf Cellulose-Vliesen aus.

Die Oberfläche der Partikel kann mit einer Vielzahl von funktionellen Gruppen oder biomolekularen Kopplungsreagenzien versehen werden. Wegen der erreichbaren hohen Empfindlichkeiten und der fehlenden Strahlenbelastung besitzt das System darüber hinaus große Vorteile gegenüber radioaktiven Markierungsreagenzien.

Projektpartner

Die vorgestellten Arbeiten werden im Rahmen eines durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) geförderten Vorhabens in Kooperation mit dem Partner Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, durchge-



Sild 2
Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von fluoreszenten Nanopartikeln

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.